

MINISTRE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

BREVET D'INVENTION

N° 900.826

Classif. Internat.: C12N-C12R

Mis en lecture le: 16-04-1985

LE Ministre des Affaires Economiques,

Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention

Vu le procès-verbal dressé le 16 octobre 1984 à 10 h 25

au Service de la Propriété industrielle

ARRÊTE :

Article 1. - Il est délivré à la Sté dite : UCB S.A.
326 avenue Louise, 1050 Bruxelles

un brevet d'invention pour Procédé de préparation d'un clone d'*Escherichia coli* produisant de la preprourokinase humaine

Article 2. - Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et périls, sans garantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit de l'exactitude de la description, et sans préjudice du droit des tiers.

Au présent arrêté demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention (mémoire descriptif et éventuellement dessins) signés par l'intéressé et déposés à l'appui de sa demande de brevet.

Bruxelles, le 16 avril

1985

PAR DELEGATION SPECIALE

le Directeur

L. WILTS

MEMOIRE DESCRIPTIF
à l'appui d'une demande de
B R E V E T d ' I N V E N T I O N
pour
Procédé de préparation d'un clone d'Escherichia coli
produisant de la preprourokinase humaine
déposé par la Société
U C B, S.A.
à Bruxelles.

Cette invention a été réalisée à l'Université Libre de Bruxelles, Faculté des Sciences, Département de Biologie moléculaire, rue des Chevaux 67, 1640 Rhode-Saint-Genèse (Belgique), par P. Jacobs, Dr. en Sciences; A. Cravador, Dr. en Sciences; R. Loriau, Technicienne; F. Brockly, Maître ès Sciences; B. Colau, Dr. en Sciences; P. Chuchana, Diplômé d'Etudes Supérieures Approfondies en Biologie Moléculaire; A. Herzog, Dr. en Sciences et A. Bollen, Dr. en Sciences.

Procédé de préparation d'un clone d'Escherichia coli produisant de la preprourokinase humaine.

La présente invention se rapporte à la préparation d'un clone d'Escherichia coli produisant de la preprourokinase humaine. Elle comprend notamment la production d'un ADN complémentaire double brin correspondant à l'information génétique caractéristique de la preprourokinase humaine (cette molécule sera appelée ci-après ADN-UK). Elle est aussi relative à des vecteurs comportant l'ADN-UK, en vue de la mise en oeuvre de ses propriétés biologiques.

L'urokinase (EC 3.4.99.26), l'un des composants du plasma sanguin, est synthétisée dans le rein et secrétée dans l'urine. Cette enzyme fonctionne essentiellement en tant qu'activateur du plasminogène. La plasmine active résultant du clivage protéolytique de son précurseur, le plasminogène, exerce une activité fibrinolytique. Dans ce contexte, l'urokinase a une valeur thérapeutique pour la dissolution de thrombi in vivo et a été produite pour cela, soit à partir d'urine, soit à partir de milieu de culture de cellules rénales humaines. Des études biochimiques sur l'urokinase ont montré l'existence de trois formes de l'enzyme. L'une a un poids moléculaire de environ 54000 daltons ; elle consiste en deux chaînes (A et B) liées par des ponts disulfures et d'un poids moléculaire respectif de 18000 et 33000 daltons. La seconde forme consiste en le polypeptide de 33000 daltons uniquement et est dérivée de la forme de haut poids moléculaire. Les deux formes, 54K et 33K daltons, sont actives et utilisées en thérapie. Leur séquence en acides aminés est connue. Leur utilisation comme agent thrombolytique a néanmoins été limitée par l'activation systémique du plasminogène qui se produit durant le traitement et augmente significativement le risque d'hémorragie.

L'existence d'une troisième forme de l'urokinase (appelée urokinase simple chaîne, sc-UK ou activateur du plasminogène rénal, k-PA, ou prourokinase, a été démontrée récemment de même que son activation par une exposition contrôlée à la plasmine. Comme la plasmine active est trouvée essentiellement liée à la fibrine où la formation de complexes avec des inhibiteurs est empêchée, la conversion de la prourokinase inactive en la molécule active pourrait se faire spécifiquement à la surface du caillot sanguin. L'utilisation thérapeutique de la prourokinase permettrait donc d'éviter les effets secondaires observés avec l'enzyme active.

La présente invention a pour objet un procédé de préparation d'un clone d'*Escherichia coli* produisant la preprourokinase humaine réalisé par le clonage dans une bactérie hôte d'un ADN complémentaire double brin à partir des ARN messagers de cellules humaines produisant de l'urokinase. Le procédé faisant l'objet de la présente invention est basé sur l'application d'une série de moyens dans un ordre bien déterminé. Il permet d'obtenir la preprourokinase humaine en quantité suffisante, notamment pour l'utiliser dans des applications thérapeutiques.

Le procédé de préparation d'un clone d'*Escherichia coli* produisant la preprourokinase humaine selon la présente invention comprend la combinaison des phases suivantes :

- a) l'extraction et la purification des ARN messagers totaux de cellules humaines produisant de l'urokinase ;
- b) la synthèse in vitro de l'ADN complémentaire double brin au départ de cet ARN messager ;
- c) l'enrichissement de la préparation d'ADN complémentaire double brin en molécules de taille supérieure ou égale à celle nécessaire pour encoder

l'urokinase ;

d) l'addition d'extrémités cohésives à cet ADN-UK ;

e) le mélange in vitro de cette fraction enrichie portant des extrémités cohésives avec un vecteur plasmide portant des extrémités cohésives complémentaires pour obtenir des molécules hybrides ;

f) la transformation des bactéries hôtes *Escherichia coli* par ces molécules hybrides ;

g) la sélection parmi ces bactéries transformées de celles qui ont inséré un fragment d'ADN humain, de manière à obtenir une banque de clones ;

h) l'isolement de cette banque des clones porteurs de l'ADN-UK par crible caractéristique de l'urokinase ;

i) l'extraction de ces clones d'ADN-UK ;

j) la construction à partir de cet ADN-UK et de l'ADN de plasmides vecteurs de molécules hybrides que l'on clone dans des bactéries hôtes *Escherichia coli* en vue de l'expression de la preprourokinase humaine ;

k) le choix des clones ayant inséré l'ADN-UK dans l'orientation et la phase de lecture correctes par analyse de restriction et séquençage de l'ADN ;

l) la démonstration par immuno-essai de la production de preprourokinase par ces clones.

L'invention a pour objet, en outre, une séquence d'ADN complémentaire double brin codant pour la preprourokinase complète désigné par ADN-UK, qui a été isolé des clones et des vecteurs qui le portent.

Elle concerne également les clones d'*Escherichia coli* portant l'ADN-UK et produisant de la preprourokinase humaine, obtenus suivant les procédés revendiqués.

La séquence de préprourokinase humaine produite suivant les procédés, objet de l'invention, comprend entre autres un peptide signal de 18 acides aminés, un peptide 18K caractérisé par un tryptophane en position 131, une lysine faisant la jonction entre les peptides

18 et 33K et un peptide 33K caractérisé par une cystéine en position 366 et une valine en position 410. Les différentes phases du procédé faisant l'objet de l'invention comprennent:

- 5 a) Les ARN messagers totaux sont extraits de cellules humaines produisant l'urokinase. (Gronow, M. and Bliem, R., Trends in Biotechnology, vol. 1, n°1, 1983, 26-29). De préférence, les ARN messagers totaux proviennent de cellules de carcinome de pharynx Détroit 10 562. Ils peuvent être extraits par différentes méthodes basées essentiellement sur la destruction complète des structures cellulaires et la dénaturation rapide et totale des activités ribonucléasiques dans l'extrait. On trouvera dans "Molecular Cloning" (1982 - Maniatis, 15 T. Fritsch, E. F. and Sambrook, J. - C. S. H. Publ.) l'état de l'art en cette matière.

A titre d'exemple, on peut recourir à l'emploi combiné de détergents, tels le NP40, et d'inhibiteurs de ribonucléase, tels le vanadyl-ribonucléoside, ou encore 20 à l'emploi d'agents chaotropiques puissants, tels les sels de guanidine.

De préférence, on choisit la méthode décrite dans Cox, R. A. (Methods Enzymol. 12B, 120, 1968), basée sur l'utilisation de chlorure de guanidine, qui conduit à 25 l'obtention d'acides ribonucléiques non dégradés et actifs.

Les ARN messagers totaux extraits de cellules humaines peuvent être purifiés en tirant parti d'une de leurs caractéristiques, à savoir la présence d'une séquence 30 polyadénylique à leur extrémité 3'. La méthode de choix consiste à réaliser une chromatographie d'affinité sur colonne d'oligo d(T) cellulose, selon le protocole décrit dans Avis, H. and Leder, P. (1972, Proc. atl. Acad. Sci. USA, 69, 1408).

- 35 b) La conversion enzymatique in vitro des ARN messagers

polyadénylés en ADN complémentaire double brin fait appel à des réactions enzymatiques dont la description détaillée est reprise dans Genetic Engineering (1981) vol. 1, pp. 9-19, Williamson, R., Ed., Academic Press, N.Y.

5 A titre d'exemple, on utilise successivement les enzymes appelés transcriptase inverse, ADN polymérase et nucléase S1 pour synthétiser l'ADN complémentaire double brin portant des extrémités franches. On peut cependant utiliser uniquement la transcriptase inverse et la nucléase S1 pour arriver au même résultat.

10 Enfin, on peut terminer la préparation de l'ADN complémentaire double brin portant des extrémités franches par un traitement à l'ADN polymérase (fragment Klenow) pour pallier aux imperfections du traitement avec la nucléase S1. De préférence, on choisit cette dernière voie dans l'exécution de l'invention.

15 c) On peut enrichir la préparation d'ADN complémentaire double brin en molécules de taille supérieure ou égale à celle nécessaire pour encoder l'urokinase en recourant aux techniques de fractionnement habituelles. De préférence, dans la réalisation de l'invention, on choisit le fractionnement sur gradient de saccharose.

20 d) Différentes méthodes ont été utilisées pour joindre l'ADN complémentaire double brin à l'ADN de vecteurs plasmides (Molecular Cloning, Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J., 1982, C. S. H. Publ.). Les plus courantes consistent à ajouter des extensions homopolymériques complémentaires aux ADN que l'on veut joindre, ou des adaptateurs synthétiques à l'ADN que l'on
30 veut introduire dans un site de restriction particulier de l'ADN du vecteur. De préférence, on choisit l'addition d'extrémités cohésives complémentaires aux ADN que l'on veut joindre. Cette technique, décrite dans Villa-Komaroff, L., Efstradiatis, A., Broome, S.,
35 Lomedico, P., Tizard, R., Naker, S. P., Chick, W. L. and

Gilbert, W. (1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75, 3727) met en oeuvre une enzyme particulière appelée transférase désoxynucléotidyle terminale.

e) La formation in vitro de molécules hybrides entre
 5 l'ADN complémentaire double brin à cloner et l'ADN de
 vecteurs plasmides s'effectue selon le procédé, décrit
 dans Molecular Cloning (1982, Maniatis, T., Fritsch,
 EF. and Sambrook, J., C.S.H. Publ.) qui consiste à
 mélanger les molécules dans des conditions de
 10 température et de force ionique appropriées. C'est ce
 protocole qui a été suivi dans la réalisation de
 l'invention. L'ADN vecteur employé dans la réaction de
 recircularisation in vitro peut provenir de différents
 plasmides. Parmi les plasmides les plus couramment
 15 utilisés, le plasmide pBR322 a été choisi comme vecteur
 préférentiel. Il contient deux sites d'insertion
 possible, PstI et BamHI. Ces deux sites conviennent à
 l'insertion de l'ADN susmentionné. (Bolivar, F.,
 Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C.,
 20 Heynecker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. and Falkow,
 S., Gene, 2, 95, 1977).

Les dérivés du plasmide pBR322 peuvent aussi convenir.
 Dans la réalisation de cette invention, on choisit de
 préférence le plasmide pBR322 dont on linéarise l'ADN
 25 et que l'on munit d'extrémités cohésives appropriées
 selon la méthode décrite plus haut. D'autres plasmides,
 tels que le pKT279, pKT280 et pKT287 peuvent être
 utilisés avantageusement.

f) La plupart des méthodes utilisées pour transformer
 30 des bactéries par de l'ADN exogène font appel à un
 traitement particulier des bactéries par du chlorure de
 calcium, et visent à optimiser l'efficacité de
 transformation pour différentes souches de bactéries.
 La présente invention est basée sur l'utilisation d'une
 35 souche d'E.coli dans les deux phases revendiquées dans

lesquelles ces bactéries interviennent. Dans le cadre de la réalisation de l'invention, plusieurs types de micro-organismes tels que d'autres bactéries ou des levures peuvent également servir d'hôtes. On prendra de
 5 préférence, la souche d'*Escherichia coli* MM294, dont les conditions de croissance sont particulièrement commodes.

En outre, parmi les différents procédés de transformation, on choisit celui décrit dans Mandel, M.
 10 and Higa, A. (1970, J. Mol. Biol. 53, 154).

g) En raison des marqueurs de résistance aux antibiotiques présents dans l'ADN du vecteur, il est simple d'isoler les bactéries transformées par l'ADN recombiné in vitro. Par exemple, si l'ADN du vecteur
 15 porte le gène Tet^R, toute bactérie portant un tel vecteur sera résistante à la tetracycline.

En outre, si l'insertion de l'ADN dans le vecteur a pour effet d'inactiver un gène de résistance à un antibiotique, on repérera les bactéries qui portent le
 20 vecteur recombinant par leur sensibilité à cet antibiotique. De préférence, on choisit comme marqueur de sélection, le caractère Tet^R du plasmide pBR322 et comme crible pour l'insertion d'ADN dans le vecteur la perte de résistance à l'ampicilline. La combinaison de
 25 ces deux facteurs conduit à l'identification de bactéries portant un vecteur recombinant.

h) Le crible de sélection des clones porteurs de l'ADN-UK peut se faire selon des méthodes mettant en oeuvre soit une sonde naturelle ou synthétique, soit
 30 des techniques d'hybridation entre l'ADN des clones et l'ARN messager, ou encore des moyens immunologiques. Ces différentes approches sont détaillées dans Genetic Engineering, vol. 1, Williamson, R. Eds., (1981) Academic Press, N.Y.

35 Dans le cadre de la présente invention, on utilise de

préférence des sondes oligodésoxyribonucléotidiques de
synthèse, caractéristiques des acides aminés
Asn-Ile-His-Trp-Cys-Asn-Cys-Pro de l'urokinase et/ou le
procédé de rétention de l'ARN messager spécifique de
5 l'urokinase humaine sur l'ADN des clones, suivi de la
traduction in vitro et de la caractérisation
immunologique.

i) L'extraction de l'ADN-UK des clones sélectionnés par
restriction peut se faire par différentes enzymes. Dans
10 le cadre de la présente invention on choisit de
préférence l'enzyme BglI.

j) La ligation de cet ADN-UK se fait avec un plasmide
vecteur. De préférence on choisit le vecteur pCQV2
(Queen, C.J., Mol. Appl. Genet. 2, 1-10, 1983) clivé
15 par l'enzyme BamHI, les deux molécules, ADN-UK et
vecteur, étant préalablement traitées à l'ADN
polymérase de T4. La transformation du vecteur hybride
a lieu dans la souche d'Escherichia coli MM294.

k) La sélection des clones ayant inséré l'ADN-UK dans
20 l'orientation et la phase de lecture correctes
s'effectue par analyse de restriction et séquençage de
l'ADN.

l) La démonstration par immuno-essai de la production
de preprourokinase par ces clones est réalisée en
25 choisissant de préférence la méthode de
l'immuno-transfert décrite dans Bollen et al., FEBS
Letters 166, 67-70 (1984) qui consiste à séparer les
protéines de l'extrait par électrophorèse sur gel de
polyacrilamide, à les transférer sur feuille de
30 nitrocellulose et à révéler la présence d'urokinase par
des anticorps anti-urokinase de souris eux-mêmes
détectés par des anticorps de chèvre anti-anticorps de
souris couplés à la peroxidase (GAM-POD).

La présente invention sera mieux comprise à l'aide de
35 l'exemple non limitatif suivant.

1. Culture de cellules

Des cellules humaines de carcinome de pharynx de la lignée Detroit 562(ATCC N°CCL138) connues pour produire de l'urokinase ont été cultivées jusqu'à confluence en milieu DMEM supplémenté pour contenir 0,4 % NaHCO₃, 10 % de serum de veau foetal, 0,1 % de mycostatine, et incubé à 37°C en atmosphère contenant 5 % de CO₂. Les cellules confluentes sont récoltées par centrifugation après traitement par 0,17 % de Trypsine pendant 5' à 37°C. Les culots sont rincés au PBS et gelés dans l'azote liquide.

2. Extraction et purification des ARN messagers totaux de cellules humaines.

Un culot de cellules gelées dans l'azote liquide a été traité au chlorure de guanidine suivant la méthode de Cox, R. A., Methods Enzymol. 12B, 120, 1968. Les ARN sont alors passés sur colonne d'oligo d(T) cellulose de façon à en récupérer les ARN messagers totaux. 260 µg d'ARN messagers totaux ont été obtenus. La fraction messagère ainsi obtenue est alors traduite en polypeptides in vitro dans un système protéo-synthétique acellulaire issu de réticulocytes de lapin (produit notamment par NEN Laboratories). L'ensemble des protéines synthétisées est alors fractionné sur gel de polyacrilamide (15 %) en conditions dénaturantes.

3. Synthèse in vitro de l'ADN complémentaire double brin correspondant à la fraction messagère enrichie.

Au départ de l'ARN messenger, on a synthétisé l'ADN qui lui correspond. Cette opération requiert la succession de plusieurs étapes enzymatiques. D'une part, à l'aide de la transcriptase réverse, on obtient la fibre d'ADN complémentaire au messenger, et d'autre part, à l'aide de la meme enzyme ou de l'ADN polymérase, on synthétise la deuxième fibre d'ADN antiparallèle à la première.

Enfin, l'action d'une troisième enzyme, la nucléase S1, permet l'obtention de molécules d'ADN en double hélice dépourvues d'extrémités monocaténares appelées usuellement extrémités franches.

5 4. Enrichissement de la préparation d'ADN complémentaire double brin en molécules de taille supérieure ou égale à celle nécessaire pour encoder l'urokinase.

La population de molécules d'ADN complémentaire étant hétérogène, on l'a fractionnée sur gradient de
10 saccharose de façon à ne conserver que la fraction contenant des molécules de taille supérieure ou égale à 1,5 kilo-bases, et donc à favoriser l'obtention de clones contenant la majorité, sinon la totalité de l'information génétique correspondant à la
15 preprourokinase. La taille minimale théorique du messenger de l'urokinase codant pour un total de 410 acides aminés comporte donc 410 codons, soit 1230 bases.

A cet effet, l'ADN complémentaire double brin a été
20 déposé sur un gradient de saccharose 10-30 % et centrifugé en rotor Beckman SW41. Les fractions correspondant à des molécules de taille supérieure ou égale à 1,5 kilo-bases ont été rassemblées.

25 5. Addition d'extrémités cohésives à la préparation d'ADN complémentaire double brin enrichie en ADN-UK.

Afin de pouvoir insérer les molécules d'ADN
complémentaire double brin dans l'ADN d'un vecteur approprié, il convient de leur ajouter des extrémités cohésives. A cet effet, on adopte la technique des
30 extensions homopolymériques décrite par Villa-Komaroff, L., Efstradiatis, A., Broome, S., Lomedico, P., Tizard, R., Naker, S. P., Chick, W. L. and Gilbert, W. (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75, 3727, 1978).

Dans ce protocole, 90 ng d'ADN complémentaire double
35 brin enrichi ont été traités par la transférase

terminale de façon à ajouter aux extrémités 3' des extensions d'oligo d(C) d'environ 15 bases de long.

6. Fabrication in vitro de recombinants entre l'ADN complémentaire double brin enrichi, portant des extrémités cohésives, et l'ADN du vecteur pBR322.

Les molécules d'ADN complémentaire double brin enrichi sont maintenant prêtes à être insérées dans l'ADN d'un vecteur plasmide. On a choisi le plasmide pBR322, portant les marqueurs de sélection Tet^R et Amp^R (résistance à la tétracycline et à l'ampicilline). L'ADN de ce plasmide porte un site unique pour l'enzyme de restriction PstI, dans le gène AmpA. Dès lors, la restriction par PstI linéarise le plasmide et offre un site d'insertion unique. Il suffit alors d'ajouter enzymatiquement par la méthode décrite en 5, des extensions oligo d(G) aux extrémités 5' de l'ADN du vecteur pour pouvoir réaliser l'insertion de l'ADN à cloner. Dans l'exemple que l'on décrit, l'ADN du vecteur pBR322 porte des extensions oligo d(G) longues de 30 bases.

Le mélange de 90 ng d'ADN complémentaire double brin enrichi avec 200 ng d'ADN de vecteur pBR322, ce qui correspond à un rapport molaire voisin de 1, s'effectue in vitro pendant 5 min. à 65°C et 1h30 à 57°C. Le mélange est alors refroidi doucement jusqu'à 4°C. Dans ces conditions les molécules d'ADN se recombinent et se recircularisent par appariement des extrémités cohésives complémentaires.

7. Clonage dans la souche d'Escherichia coli MM294.

On procède alors à la transformation de la souche MM294 dont le système de restriction-modification est modifié de façon à tolérer la présence d'un ADN étranger selon la méthode décrite dans Molecular Cloning, Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J., 1982, C. S. H. Publ. Au sein de la bactérie, les extrémités cohésives

incomplètes sont réparées par une enzyme de l'hôte avec pour conséquence la régénération du site de restriction PstI dans l'ADN du plasmide recombinant.

8. Obtention de la banque de clones.

5 En raison du caractère Tet^R du plasmide, on peut sélectionner les bactéries transformées par simple croissance sur milieu contenant de la tétracycline. Enfin, parmi les souches Tet^R, on peut identifier
10 celles qui ont un plasmide chimérique par le fait qu'elles ne poussent pas en présence d'ampicilline puisque l'insertion d'ADN étranger dans le gène AmpA du vecteur a inactivé ce gène.

L'ensemble des manipulations décrites ci-dessus a conduit à l'obtention d'une banque de 5000 clones, dont
15 une partie doit contenir des séquences d'ADN codant pour l'urokinase.

9. Caractérisation d'un clone porteur de l'ADN-UK.

On a recherché les clones porteurs de l'ADN-UK au moyen d'une sonde synthétique correspondant à un fragment du
20 gène de l'urokinase.

La séquence en acides aminés de l'urokinase humaine est connue. Sur base de cette information, on synthétise chimiquement selon la méthode de Hsiung, H. M., Brosseau, R., Michnicwicz, J. and Narang, S. A. (1979, Nucleic Acids Research 6, 1371) un mélange
25 d'oligodésoxyribonucléotides de 23 bases correspondant aux acides aminés Asn-Ile-His-Trp-Cys-Asn-Cys-Pro, typiques de l'urokinase humaine (positions 27 et 34 dans la chaîne A. Après avoir marqué cette sonde au
30 ³²P par une réaction enzymatique (kination en 5' de la sonde), nous l'avons utilisée pour cribler la banque de clones. Pratiquement, on fixe l'ADN de chaque clone sur feuille de nitrocellulose, suivant la technique de Grunstein, M. and Hogness, D. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961, 1975) et on l'hybride avec la sonde
35

synthétique marquée au ^{32}P . Dans des conditions ioniques et de température appropriées (0,9 M NaCl et 28°C), la sonde radioactive va reconnaître spécifiquement l'ADN des clones portant une séquence
 5 homologue, c'est-à-dire une séquence de nucléotides typique de l'urokinase humaine. On visualise les clones positifs par autoradiographie. Cette méthode a permis d'identifier 1 clone (sur 5000 analysés) portant tout l'ADN-UK.

10 A partir du clone sélectionné, désigné par pULB1000, on caractérise l'ADN-UK par l'établissement d'une carte de restriction. A cet effet, l'ADN inséré, isolé du plasmide par restriction PstI, est digéré par une ou
 15 plusieurs autres enzymes de restriction. L'alignement des fragments obtenus permet d'obtenir une carte de restriction. Les informations contenues dans cette carte permettent de générer des fragments d'ADN que l'on peut aisément marquer au ^{32}P . Le fragment marqué est alors soumis à une série de réactions chimiques
 20 conduisant à la production d'oligonucléotides marqués, de tailles différentes, dont l'analyse sur gel de polyacrylamide conduit à l'établissement de la séquence en bases, suivant la technique de Maxam, A.M. et Gilbert, W., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560.

25 La séquence est établie parallèlement et donc confirmée par la méthode de Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5463-5467, 1977). On voit dans la figure 1 que l'ADN cloné dans pULB 1000 contient le codon initiateur ATG et que la séquence des 57 bases en aval de ce
 30 triplet code pour une séquence en acides aminés ayant les caractéristiques d'un peptide signal. On trouve ensuite successivement la séquence codant pour le peptide 18K, un triplet AAG codant pour une lysine, la séquence codant pour le peptide 33K, un codon opale (TGA) et une séquence non codante. Il est à remarquer

35

- que la séquence en acides aminés déduite de la séquence du cDNA correspond aux séquences publiées de l'urokinase (Steffens et al., Mapped-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 1043-1058, 1982) à trois exceptions près : l'acide aminé 131 (numéroté à partir du premier acide aminé de la chaîne A) est un tryptophane au lieu d'une cystéine, et les acides aminés 366 et 410 sont une cystéine à la place d'une glycine et une valine à la place d'une alanine.
- 10 Le fragment d'ADN-UK porté par le clone sélectionné code pour la totalité de la preprourokinase. Par ailleurs, on construit un vecteur hybride portant l'ADN codant pour la preprourokinase dans l'orientation correcte et dans la bonne phase de lecture. Dans ce
- 15 cas, on s'attend à observer la synthèse de la preproprotéine humaine. La construction de ce vecteur hybride met en oeuvre les étapes suivantes (Fig. 2) :
10. Extraction de l'ADN-UK par restriction BglI de l'ADN du vecteur hybride du clone pULB 1000 et traitement à la
- 20 DNA-polymérase de T4 pour générer des extrémités franches.
11. Mélange de cet ADN-UK avec l'ADN du vecteur pCQV2 linéarisé par restriction BamHI puis traité à la DNA-polymérase de T4 pour générer des extrémités
- 25 franches ; ligation des fragments d'ADN par une enzyme (ligase) pendant 16 heures à 4 °C et transformation de la bactérie MM294.
12. Parmi celles-ci, on identifie celles qui portent l'ADN-UK dans l'orientation correcte en réalisant une
- 30 carte de restriction du vecteur hybride. On obtient ainsi une souche appelée pULB 1135 caractérisée par le fait qu'elle porte l'ADN-UK dans la bonne orientation et dans la bonne phase de lecture derrière le promoteur pr du plasmide pCQV2.
- 35 13. Pour démontrer la synthèse de preprourokinase

humaine dans les bactéries MM294 portant le vecteur hybride du clone pULB 1135; on s'appuie sur un essai immunologique permettant de détecter la protéine dans des extraits bactériens totaux.

- 5 Lorsqu'on applique ce système aux extraits provenant des bactéries portant les différents vecteurs, on constate que, comme on s'y attend, la souche témoin portant le plasmide pCQV2 ne synthétise pas de preprourokinase, ni à 32°C ni à 42°C, alors que pour le clone pULB 1135, on détecte la présence de cette protéine à 42°C.
- 10

Les souches pULB 1000 et pULB 1135 mentionnées ci-avant ont fait l'objet de dépôts à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (Service autonome de l'Institut Pasteur) sous les numéros de dépôt respectifs I-349 et I-350.

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'un clone d'*Escherichia coli* produisant une preprourokinase humaine caractérisé en ce que on extrait et on purifie les ARN messagers totaux de cellules humaines produisant de l'urokinase, on effectue la synthèse in vitro de l'ADN complémentaire double brin au départ de cet ARN messenger, on enrichit la préparation d'ADN complémentaire double brin en molécules de taille supérieure ou égale à celle nécessaire pour encoder l'urokinase, on ajoute des extrémités cohésives à cette préparation d'ADN complémentaire double brin enrichie en ADN-UK, on mélange in vitro cette fraction enrichie portant des extrémités cohésives avec un vecteur plasmide portant des extrémités cohésives complémentaires pour obtenir des molécules hybrides, on transforme des bactéries hôtes *Escherichia coli* par ces molécules hybrides, on sélectionne parmi ces bactéries transformées celles qui ont inséré un fragment d'ADN humain de manière à obtenir une banque de clones, on isole de cette banque les clones porteurs de l'ADN-UK par crible caractéristique de l'urokinase humaine, on extrait de ces clones l'ADN-UK, on construit à partir de cet ADN-UK et de l'ADN de plasmides vecteurs des molécules hybrides que l'on clone dans des bactéries hôtes *Escherichia coli* en vue de l'expression de la preprourokinase humaine, on choisit les clones ayant inséré l'ADN-UK dans l'orientation et la phase de lecture correctes par analyse de restriction et séquençage de l'ADN et on démontre par immuno-essai la production de preprourokinase dans ces clones.
2. Procédé de préparation d'un clone d'*Escherichia coli* produisant la preprourokinase humaine suivant la revendication 1, caractérisé en ce que les cellules humaines produisant de l'urokinase proviennent de la

lignée de carcinome de pharynx Detroit 562 et en ce que le vecteur plasmide choisi pour la première phase est le pBR322 et pour la seconde phase le pCQV2.

3. Procédé de préparation d'un clone d'*Escherichia coli* produisant la preprourokinase humaine suivant les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que l'ADN complémentaire enrichi en ADN-UK est inséré dans le site PstI du gène AmpA du vecteur plasmide pBR322 pour la première phase et dans le site BamHI du vecteur pCQV2 pour la deuxième phase.
4. Procédé de préparation d'un clone d'*Escherichia coli* produisant la preprourokinase humaine suivant les revendications 1 à 3, caractérisé par l'utilisation comme crible des sondes oligodésoxyribonucléotidiques de synthèse caractéristiques des acides aminés Asn-Ile-His-Trp-Cys-Asn-Cys-Pro de l'urokinase humaine.
5. Procédé de préparation d'un clone d'*Escherichia coli* produisant la preprourokinase humaine, caractérisé en ce que l'on extrait les ARN messagers totaux de cellules de carcinome de pharynx humaines (DT562) par utilisation comme agent chaotropique de chlorure de guanidine et on les purifie par chromatographie d'affinité sur colonne d'oligo d(T) cellulose, on effectue la synthèse in vitro de l'ADN complémentaire double brin par utilisation de la transcriptase inverse et de la nucléase S1 et par traitement ultérieur avec l'ADN polymérase, on enrichit la préparation d'ADN complémentaire double brin en molécules de taille supérieure ou égale à celle nécessaire pour encoder l'urokinase par fractionnement sur gradient de saccharose, on ajoute des extrémités cohésives à cette préparation d'ADN complémentaire double brin enrichie en ADN-UK par utilisation de l'enzyme appelée transférase désoxynucléotidyle terminale, on mélange in vitro cette fraction enrichie portant des extrémités

cohésives avec un vecteur plasmide du type pBR322, portant des extrémités cohésives complémentaires pour obtenir des molécules hybrides, on transforme les bactéries hôtes *Escherichia coli* MM294 par ces

5 molécules hybrides, on sélectionne parmi ces bactéries celles qui ont inséré un fragment d'ADN humain en choisissant comme marqueur de sélection le caractère Tet^r du plasmide pBR322 et comme crible pour l'insertion d'ADN dans le vecteur la perte de

10 résistance à l'ampicilline, on utilise comme crible caractéristique de l'urokinase humaine des sondes oligodésoxyribonucléotidiques synthétiques, on extrait de ces clones l'ADN-UK, on construit à partir de cet ADN-UK et de l'ADN de plasmides vecteurs, des molécules

15 hybrides que l'on clone dans des bactéries hôtes *Escherichia coli*, on sélectionne les clones transformés portant un plasmide dans lequel l'ADN-UK est inséré dans la bonne orientation et la phase correcte de lecture, et on caractérise immunologiquement le produit

20 synthétisé par l'emploi d'anticorps.

6. Une séquence d'ADN complémentaire double brin codant pour le polypeptide preprourokinase complet désigné par ADN-UK obtenu suivant les revendications 1 à 5.

7. Clones d'*Escherichia coli* portant l'ADN-UK et

25 produisant de la preprourokinase humaine, obtenus suivant les revendications 1 à 6.

8. Clones d'*Escherichia coli* portant l'ADN-UK et produisant de la preprourokinase humaine, obtenus

30 suivant les revendications 1 à 6, caractérisés en ce que la séquence de préprourokinase humaine produite comprend un peptide signal de 18 acides aminés, un peptide 18K caractérisé par un tryptophane en position 131, une lysine faisant la jonction entre les peptides 18 et 33K et un peptide 33K caractérisé par une

35 cystéine en position 366 et une valine en position 410;

ces clones ayant fait l'objet d'un dépôt à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (Service autonome de l'Institut Pasteur), sous les numéros de dépôt respectifs I-349 et I-350.

U C B, S.A.
par procuration:

Bruxelles, le 16 octobre 1924


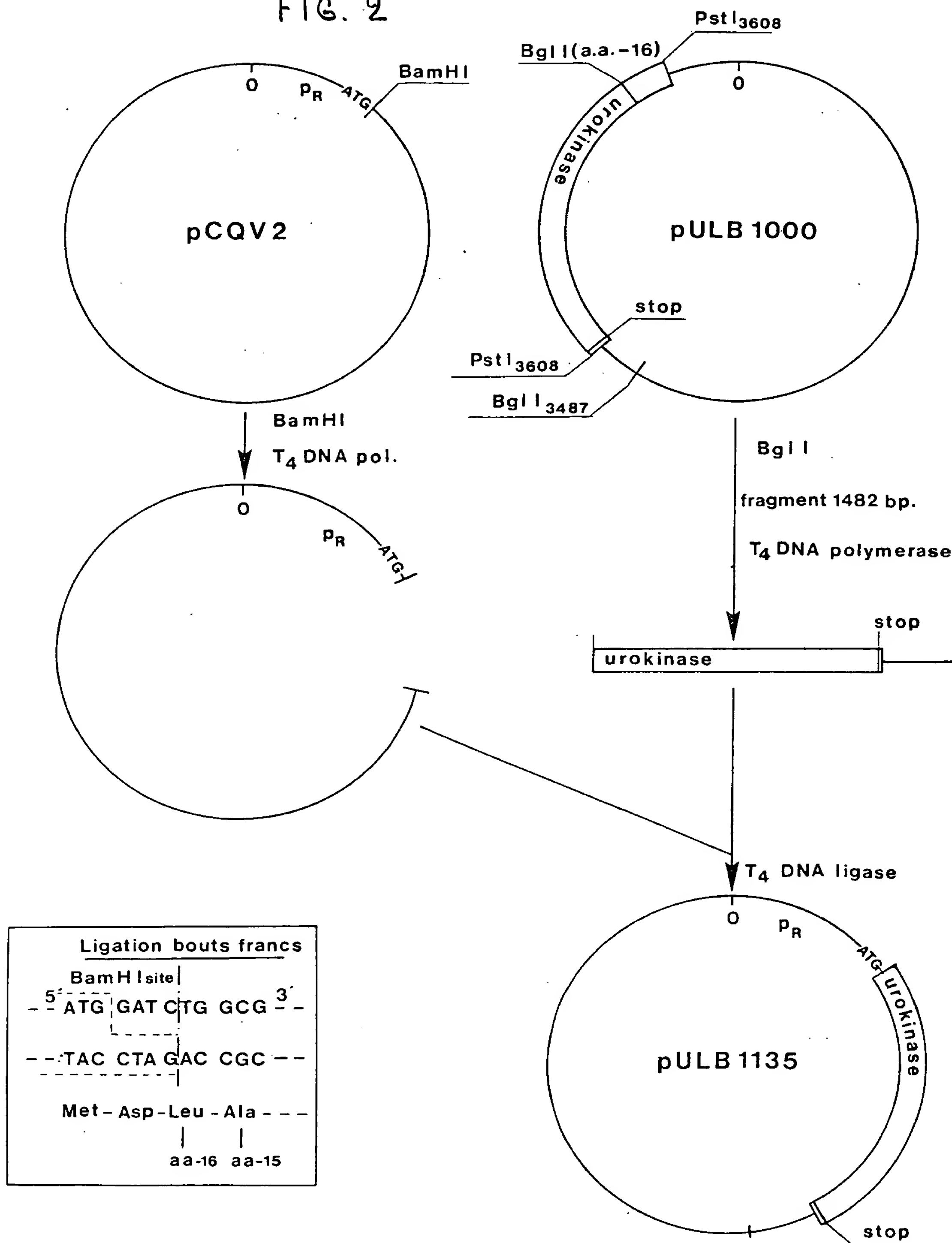


FIG. 1

U C B, S.A.
par procuration:

[Handwritten signature]

FIG. 2



Bruxelles, le 16 octobre 1984

U C B , S . A .
par procuration:

[Signature]

